

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ольховский И.А.<sup>1,2</sup>, Горбенко А.С.<sup>1,2</sup>, Столяр М.А.<sup>1,2</sup>, Бахтина В.И.<sup>3,4</sup>, Михалёв М.А.<sup>3</sup>, Ольховик Т.И.<sup>3</sup>, Судариков А.Б.<sup>5</sup>, Сидорова Ю.С.<sup>5</sup>, Поспелова Т.И.<sup>6</sup>, Колесникова М.А.<sup>6</sup>, Капорская Т.С.<sup>7</sup>, Лыскова В.А.<sup>7</sup>

### ИССЛЕДОВАНИЕ мРНК ГЕНОВ *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* И *HMGA2* В ОБРАЗЦАХ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ

<sup>1</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, Красноярск, Россия;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия;

<sup>5</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;

<sup>6</sup>ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, Новосибирск, Россия;

<sup>7</sup>ГБУЗ Иркутская ордена «Знак почета» областная клиническая больница, 664003, Иркутск, Россия

*Известно, что повышенная экспрессия генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* вовлечена в патогенез онкогематологических заболеваний. Высказано предположение, что одновременное количественное определение комплекса мРНК в циркулирующих в крови клетках может отражать специфику патологических пролиферативных процессов, а соотношение экспрессии отдельных мРНК может стать полезным диагностическим маркером. Транскриптомный профиль клеток острого лейкоза как правило оценивается с использованием дорогостоящих технологий NGS и микроцитирования после предварительной процедуры выделения мононуклеаров. Однако до сих пор не публиковались результаты использования мультиплексной реакции ПЦР одновременного определения всех указанных выше мРНК в образцах цельной крови. Цель: определение уровня мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в пробах венозной крови методом мультиплексной ОТ-ПЦР.*

*В работу включено 127 образцов крови пациентов, обследованных при первичном обращении с последующим подтвержденным диагнозом острого лейкоза. В качестве групп сравнения были выбраны 87 проб пациентов не имеющих онкогематологического диагноза, в том числе 31 образец (K1) с нормальной формулой клеток крови и 56 образцов (K2) с нарушением клеточного состава – анемией, лейкоцитозом и тромбоцитопенией. Выделение РНК из проб цельной крови, и обратную транскрипцию выполняли с использованием наборов «Рибо-золь-D» и «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Определение уровня экспрессии мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* методом мультиплексной ПЦР-РВ выполняли с использованием разработанного in house метода мультиплексной ПЦР. Уровень мРНК исследуемых генов, характеризовался высокой межиндивидуальной вариацией и не коррелировал с количеством циркулирующих лейкоцитов или бластных клеток крови. Экспрессия мРНК *WT1* определялась в цельной крови только у одного пациента из группы сравнения и в 112 (88%) пробах пациентов с лейкозом и сочеталась со снижением уровня экспрессии мРНК *HMGA2* и высокими значениями мРНК *BAALC*. В отличие от групп сравнения у пациентов с лейкозом наблюдались более высокие уровни мРНК *BAALC* при ОМЛ и ОЛЛ, повышенные значения мРНК *PRAME* при ОМЛ и ОЛЛ, но более низкие уровни *HMGA2* при ОЛЛ. Впервые в мультиплексном формате ПЦР одновременно определены уровни пяти мРНК *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови у пациентов с острыми лейкозами. С учетом наиболее выраженного преобладания вклада одной из мРНК в их суммарном уровне экспрессии, предложено выделять отдельные типы преимущественной экспрессии (ВЕРН-критерий), отличающиеся в разных нозологических вариантах лейкозии. Полученные данные поддерживают гипотезу патогенетической роли дисбаланса РНК и формировании различных транскриптомных субпопуляций лейкоэмических клеток.*

**Ключевые слова:** острые лейкозы; мРНК; *WT1*; *BAALC*; *EVII*; *PRAME*; *HMGA2*; мультиплексная ОТ-ПЦР.

**Для цитирования:** Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Михалёв М.А., Ольховик Т.И., Судариков А.Б., Сидорова Ю.С., Поспелова Т.И., Колесникова М.А., Капорская Т.С., Лыскова В.А. Исследование мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 613-620. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-613-620>

**Для корреспонденции:** Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, дир. Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»; e-mail: [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках государственного заказа «Разработка диагностических наборов реагентов для молекулярно-генетического выявления онкогенных транскриптов с целью ранней диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах № РКАААА-А20-120021890163-5».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность зав. лаб. Областной детской клинической больницы г. Екатеринбург, доц. каф. Уральского государственного медицинского университета, д-ру мед. наук Г.А. Цауру за обсуждение и ценные критические замечания.

Поступила 04.05.2022

Принята к печати 12.05.2022

Опубликовано 14.10.2022

Olkhovskiy I.A.<sup>1,2</sup>, Gorbenko A.S.<sup>1,2</sup>, Stolyar M.A.<sup>1,2</sup>, Bakhtina V.I.<sup>3,4</sup>, Mikhalev M.A.<sup>3</sup>, Olkhovik T.I.<sup>3</sup>, Sudarikov A.B.<sup>5</sup>, Sidorova Yu.S.<sup>5</sup>, Pospelova T.I.<sup>6</sup>, Kolesnikova M.A.<sup>6</sup>, Kaporskaya T.S.<sup>7</sup>, Lyskova V.A.<sup>7</sup>

STUDY OF MRNA OF *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* AND *HMGA2* GENES IN WHOLE BLOOD SAMPLES

<sup>1</sup>Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, Krasnoyarsk, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

<sup>3</sup>Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

<sup>4</sup>Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

<sup>5</sup>«National Research Center for Hematology» Department of Health, Moscow, Russian Federation;

<sup>6</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation;

<sup>7</sup>State-financed health care institution, a winner of the "Mark of the Honor" award, Irkutsk regional clinical hospital, Irkutsk, Russian Federation

*Simultaneous quantitative measurement of mRNA of the WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes in whole blood samples reflects the specific pathological proliferative activity in acute leukemia and their ratio is promising as a diagnostic marker. The transcriptome profile of acute leukemia cells is usually assessed using NGS or microarray techniques after a preliminary procedure for isolation of mononuclear cells. However, the results of using the multiplex PCR reaction for the simultaneous determination of all above mRNAs in whole blood samples have not been published so far. Determination of mRNA of WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes in venous blood level samples by multiplex RT-PCR.*

*The study included 127 blood samples from patients who diagnosis of acute leukemia was subsequently confirmed. In the comparison group, 87 samples of patients without oncohematological diagnosis were selected, including 31 samples (K1) with a normal blood formula and 56 samples (K2) with a violation of the cellular composition - anemia, leukocytosis and thrombocytopenia. RNA isolation and reverse transcription were performed using the Ribozol-D and Reverta-L kits (TsNIE, Russia). Determination of the mRNA expression level of the WT1, BAALC, EVII, PRAME and HMGA2 genes by multiplex real-time PCR using a homemade multiplex PCR kit.*

*The mRNA level was characterized by high interindividual variation and did not correlate with the rate of circulating leukocytes or blood blasts. Expression of WT1 mRNA was observed in whole blood only in one patient from the control group and in 112 (88%) patients with leukemia and was combined with a decrease in the level of HMGA2 mRNA expression and BAALC mRNA values. In contrast to the control groups, patients with leukemia had higher levels of BAALC mRNA in AML and ALL, increased PRAME mRNA in AML and APL, but lower levels of HMGA2 in APL.*

**Key words:** acute leukemia; mRNA; *WT1*; *BAALC*; *EVII*; *PRAME*; *HMGA2*; multiplex RT-PCR.

**For citation:** Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Mikhalev M.A., Olkhovik T.I., Sudarikov A.B., Sidorova Yu.S., Pospelova T.I., Kolesnikova M.A., Kaporskaya T.S., Lyskova V.A. Study of mRNA of *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* and *HMGA2* genes in whole blood samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (10): 613-620 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-613-620>

**For correspondence:** Olkhovskiy I.A., PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

**Information about authors:**

Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>;

Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>;

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>;

Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>;

Mikhalev M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>;

Olkhovik T.I., <https://orcid.org/0000-0002-4526-1920>;

Sudarikov A.B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>;

Sidorova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-1936-0084>;

Pospelova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-1261-5470>;

Kolesnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-3647-692X>;

Kaporskaya T.S., <https://orcid.org/0000-0002-4059-8209>;

Lyskova V.A., <https://orcid.org/0000-0003-2217-2180>.

**Funding.** *This study was carried out within the framework of the state order "Development of diagnostic reagent kits for molecular genetic detection of oncogenic transcripts for the purpose of early diagnosis and monitoring of minimal residual disease in acute leukemia No. RK AAAA-A20-120021890163-5".*

**Conflict of interest.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *The authors are grateful to the Head Laboratory of the Yekaterinburg Regional Children's Clinical Hospital, associate Professor of the Department of the Ural State Medical University, G.A. Tsaur for discussions and valuable critical remarks.*

Received 04.05.2022

Accepted 12.05.2022

Published 14.10.2022

**Введение.** Результаты последних 30 лет исследований молекулярного патогенеза острого лейкоза выявили высокогетерогенную генетическую природу заболевания, включающую в себя различные хромо-

сомные aberrации, ряд соматических точечных мутаций, выраженные сдвиги экспрессии как матричных, так и некодирующих РНК [1, 2]. Выявление цитогенетических поломок и анализ химерных транскриптов в

лейкозных клетках включены в клинические рекомендации в качестве важных диагностических маркеров [3, 4]. Поскольку цитогенетические нарушения при острых лейкозах выявляются примерно в половине случаев, перспективы дальнейшего поиска новых диагностических маркеров во многом связаны с результатами исследования специфического профиля РНК (транскриптома). Использование транскриптомного анализа позволяет оценить активность различных генов в онкотрансформированных клетках. Вместе с тем, его широкое применение в клинической практике сдерживается низкой доступностью, дороговизной и трудоемкостью использования аналитических платформ на основе микрочипирования и секвенирования РНК. Очевидно, что решение этой проблемы может быть реализовано выбором ограниченного числа наиболее информативных РНК-маркеров и внедрением методик для рутинного ПЦР-тестирования.

Уже достаточно давно [1–12] при онкологических, в том числе и онкогематологических заболеваниях исследуется экспрессия таких генов как *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME*, *HMGA*. Эти гены участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток, активно экспрессируются в CD34+ кроветворных клетках, но уровни их мРНК быстро снижаются в процессе созревания форменных элементов крови. Исследования роли указанных генов в развитии острых лейкозов доказывают, что их избыточная экспрессия способствует прогрессии заболевания, а определение уровня соответствующих мРНК было предложено в качестве прогностических маркеров. Недавно опубликован результат метаанализа [15] данных прогностического значения оценки мРНК трех генов *WT1*, *BAALC* и *EVII*, а также результаты исследования, в котором с помощью ПЦР-РВ в пробах костного мозга оценивалось прогностическое значение экспрессии параллельно двух генов *WT1*, *BAALC* у 14 пациентов с гиперэкспрессией *EVII* в ответе на химиотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток при ОМЛ [9]. Авторы пришли к выводу, что такой «подход представляется перспективным для исследования патогенетических механизмов и может быть весьма важным для клинической практики».

Учитывая наличие дополнительной диагностической значимости экспрессии генов *PRAME* и *HMGA2*, представляется актуальным возможность одновременного выполнения тестирования всех пяти выбранных мРНК-маркеров в образцах цельной крови методом мультиплексной ПЦР.

Цель работы: определение уровня мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в пробах венозной крови методом мультиплексной ПЦР-РВ.

**Материал и методы.** В исследование включены аликвоты крови из оставшегося объема проб после выполнения рутинного гематологического анализа. В данной работе использовалась лишь ограниченная информация о возрасте, половой принадлежности пациентов и результатах гематологического анализа без учета иных персональных данных, особенностей клинической картины заболевания или результатов других исследований.

Из поступивших в лабораторию 147 образцов крови мультиплексный тест ПЦР-РВ был полностью выполнен для 127 образцов крови пациентов, обследованных при первичном обращении, в том числе, пациентов с последующим подтверждением диагноза: ОМЛ ( $n=95$ ), с ОПЛ ( $n=7$ ), с ОЛЛ ( $n=19$ ), с ОЛ смешанного фенотипа ( $n=1$ ) и 5 пациентов с неуточненным диагнозом острого лейкоза на момент выполнения исследования. В качестве групп сравнения были выбраны пробы пациентов, не имеющих онкогематологического диагноза, в том числе 31 образец (К1) с нормальной формулой клеток крови и 56 образцов (К2) с нарушением клеточного состава – анемией, лейкоцитозом и тромбоцитопенией. Выделение РНК из проб цельной крови, и обратную транскрипцию выполняли с использованием наборов «Рибо-золь-Д» и «Реверта-Л» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Определение уровня экспрессии мРНК генов *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* выполняли с использованием разработанного метода мультиплексной ПЦР-РВ. Использовали следующую программу амплификации: предварительный прогрев при 95°C – 5 мин, далее 50 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 60 с, детекция флуоресцентного сигнала проводилась по каналам FAM, ROX и HEX в ходе ПЦР-РВ. Для нормализации получаемых данных в качестве гена «домашнего хозяйства» использовали ген *ABL1*. Уровень экспрессии исследуемых мРНК выражали в количестве молекул на 10 000 молекул *ABL1*. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программ пакета R. Проверка нормальности распределения количественных признаков с использованием критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерия Шапиро-Уилка показала, что полученные данные не подчиняются закону нормального распределения, поэтому для дальнейшего анализа использовали непараметрические методы статистики. Значимость отличий в несвязанных выборках оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и с помощью критерия Краскелла-Уолисса при сравнении более двух групп, различия оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводили с использованием метода Спирмена.

**Результаты.** Уровень мРНК исследуемых генов характеризовался высокой межиндивидуальной вариацией (рис. 1, а–д) и их значения не коррелировали с количеством циркулирующих лейкоцитов или бластных клеток крови. В отличие от групп сравнения у пациентов с лейкоемией наблюдались более высокие уровни мРНК *BAALC* при ОМЛ и ОЛЛ, повышенные значения мРНК *PRAME* при ОМЛ и ОПЛ, но более низкие уровни *HMGA2* при ОПЛ.

Медиана значений экспрессии мРНК *EVII* была более высокой в выборке пациентов с нарушенной формулой крови в сравнении с выборкой здоровых доноров. Экспрессия мРНК *WT1* определялась в цельной крови только у одного пациента из группы сравнения и в 112 (88%) пробах первичных пациентов. Пробы крови с повышенной экспрессией *WT1* преимущественно принадлежали пациентам с ОМЛ

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

и сочетались со статистически значимым снижением уровня экспрессии мРНК *HMG2* и более высокими значениями мРНК *BAALC* (см. таблицу).

В ряде проб крови у пациентов с лейкозами обнаружено выраженное преобладание уровня одной из исследуемых нами мРНК. Учитывая высокую степень вариации абсолютных значений экспрессии мРНК для дальнейшего анализа мы разделили всю выборку образцов в зависимости от вклада каждой из

мРНК в их суммарный уровень, обозначая эти группы по первой букве названия соответствующего гена типа Н-тип экспрессии (мРНК *HMG2* вклад >30%), Е- (мРНК *EVII* >30%), Р- (мРНК *PRAME* >30%) и В- тип (мРНК *BAALC* >90%). Особенность выбора такого уровня вклада *BAALC* была обусловлена значительно более частой встречаемостью высоких значений вклада мРНК этого гена по сравнению с другими и поэтому была принята величина больше,

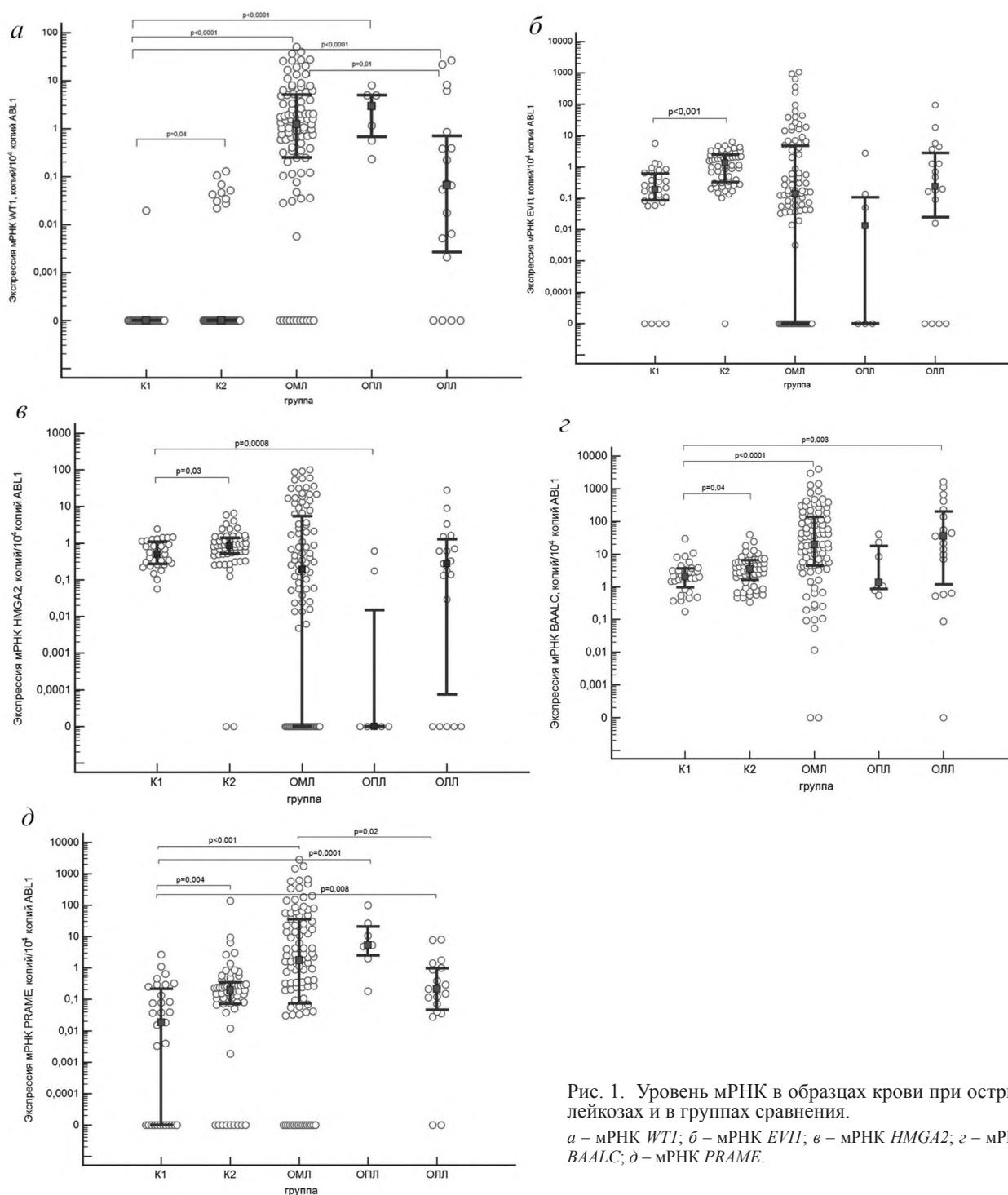


Рис. 1. Уровень мРНК в образцах крови при острых лейкозах и в группах сравнения.  
 а – мРНК *WT1*; б – мРНК *EVII*; в – мРНК *HMG2*; г – мРНК *BAALC*; д – мРНК *PRAME*.

Сравнение уровня мРНК и бластных клеток в зависимости от сопутствующей экспрессии мРНК *WT1*, *Me* ( $C_{25}$ - $C_{75}$ )

Показатели	<i>WT1</i> <0,01	<i>WT1</i> >0,01	P-уровень
Всего	16	111	
Из них с ОЛЛ	4	14	-
<i>WT1</i>	0	1,51 (0,39-5,36)	
<i>HMGA2</i>	0,45 (0-2,95)	0,17 (0-3,39)	0,04
<i>PRAME</i>	0,37 (0,06-5,22)	1,63 (0,07-26,3)	н.д.
<i>EVII</i>	0,16 (0-4,75)	0,15 (0,003-3,6)	н.д.
<i>BAALC</i>	6,53 (0,34-16,77)	31,17 (4,36-186,7)	0,01
Бласты в крови	39,0 (14,0-88,7)	56,0 (18,0-85,0)	н.д.
Бласты в костном мозге	79,0 (30,0-84,5)	77,3 (54,0-87,0)	н.д.

Примечание. н.д. – нет статистически значимых отличий.

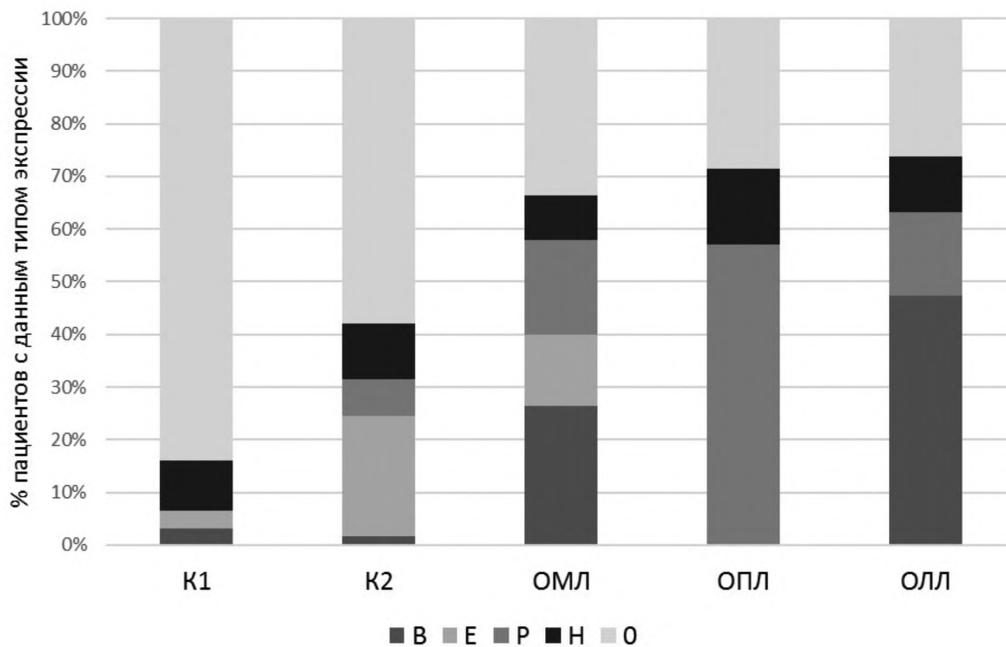


Рис. 2. «ВЕРН-типы» экспрессии в контроле и при острых лейкозах: В-В-тип экспрессии, Е-Е-тип экспрессии, Р-Р-тип экспрессии, Н-Н-тип экспрессии, О-без преимущественного типа экспрессии.

чем  $Me+C_{75}$ . Результаты распределения обозначенных выше типов экспрессии среди пациентов с разными вариантами острого лейкоза представлены на рис. 2.

Преимущественный В-тип определяется у единичных пациентов из контрольных групп группы, но при этом был выражен у 24% пациентов с ОМЛ и у 47% при ОЛЛ.

Е-тип экспрессии обнаруживался у 7 пациентов группы сравнения К2 (12%), и только у одного из группы К1 (3%), а также выявлялся в сочетании с *WT1* у 15% у пациентов с ОМЛ, но не при ОПЛ или ОЛЛ. Пробы с Е-пиком характеризовались максимально высокими значениями мРНК *WT1* и *HMGA2*.

Р-тип экспрессии наблюдался всего в 3 (5%) образцах крови пациентов из группы сравнения К2, но у 25% пациентов с ОМЛ и у 15% пациентов с ОЛЛ, а

также у большинства (58%) пациентов с ОПЛ. В пробах с Р-типом экспрессии наблюдались близкие к нулю значения экспрессии мРНК *HMGA2* и сниженные уровни мРНК *BAALC*.

Преобладающий Н-тип определялся примерно одинаково (7–12%) среди пациентов контрольных групп и пациентов с первичным ОЛ. Примеры индивидуальных особенностей соотношения уровней исследуемых мРНК представлены на рис. 3, а–г.

**Обсуждение.** Трудоемкость и длительность выполнения цитогенетического анализа, дороговизна и низкая доступность метода FISH являются побуждающим стимулом поиска маркеров, определяемых распространенными в клиничко-диагностических лабораториях методами ПЦР. С этой целью проводят анализ выявления и количественной оценки уровня

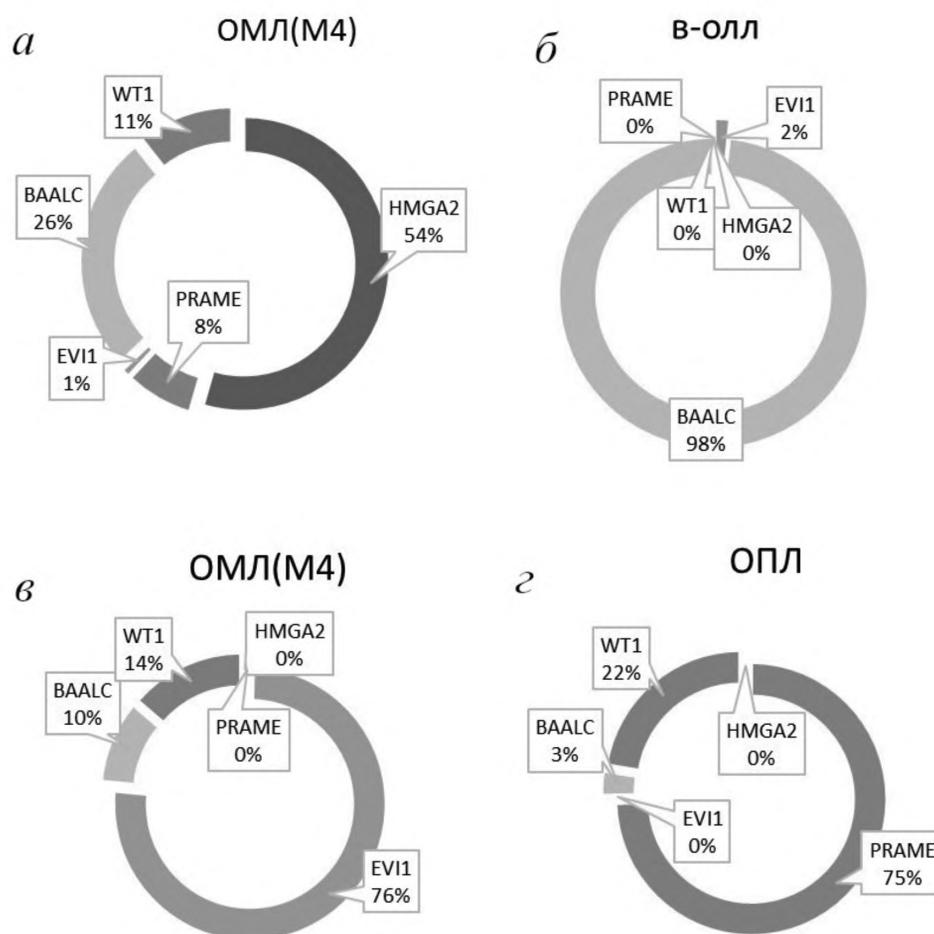


Рис. 3. Примеры индивидуальных соотношений уровня мРНК: а – Н-тип у пациента с ОМЛ (M4); б – В-тип у пациента с В-ОЛЛ; в – Е-тип у пациента с ОМЛ (M4); г – Р-тип у пациента с ОПЛ.

специфических химерных транскриптов, однако низкая их выявляемость при острых лейкозах ограничивает целесообразность использования данных тестов на первом этапе диагностики лейкоза. Поэтому более часто встречающиеся, но менее специфические маркеры экспрессии отдельных онкогенов, могут заполнить диагностическую нишу ПЦР-тестов, особенно для случаев заболевания с нормальным кариотипом лейкозных клеток. Неоднократно описано прогностическое значение при острых лейкозах мРНК *WT1* [5, 7, 9, 15], *BAALC* [6, 9, 10, 15], *EVI1* [6, 9, 10, 15], *PRAME* [11] и *HMGA2* [12, 14]. При этом показано, что гиперэкспрессия только одного гена *WT1* не подходит для использования в качестве прогностического маркера, поскольку его высокая экспрессия может оказывать и положительное влияние на выживание, когда исключены влияния неблагоприятных мутаций и других маркеров экспрессии генов [15].

При первичном тестировании гиперэкспрессия генов *BAALC* либо *EVI1* выявляет пациентов с низкой частотой полной ремиссии и более короткой выживаемостью [15–17], а уровни экспрессии *BAALC* связаны с мутационным статусом *FLT3-ITD*, *NPM1*, *KMT2A-PTD* и *CEBPA* [18]. Известно, что высокая экспрессия

*EVI1* при ОМЛ с цитогенетическими аномалиями хромосомы 3q, моносомией хромосомы 7 и aberrациями хромосомы 11q23 [19, 20], коррелирует с неблагоприятным исходом. При использовании маркера мРНК *HMGA2* недавно продемонстрирована возможность в 18% (~7% всех обследованных пациентов с ОМЛ) переквалификации степени риска ОМЛ, определенного по критериям ELN [16]. Авторы пришли к выводу, что гиперэкспрессия *HMGA2* объединяет отрицательное прогностическое значение, обусловленное комплексным кариотипом и несколькими мутациями с низким риском, что может упростить прогностическую оценку положительных случаев. Таким образом, анализ экспрессии этих генов является дополнительным информативным критерием прогноза.

Вместе с тем, отсутствие доступных коммерческих наборов реактивов, стандартов и контрольных материалов ограничивают внедрение данных тестов в клиническую практику.

В настоящей работе была впервые осуществлена попытка одновременного определения комплекса мРНК из пяти генов методом мультиплексной ПЦР-РВ в цельной крови. Действительно, отдельно каждый из этих маркеров нельзя признать высоко-

специфичным, так как экспрессию указанных мРНК можно наблюдать в клетках крови не только при онкогематологических заболеваниях. Очевидно, источником мРНК в данном случае могут быть незрелые клеточные элементы, сохраняющие РНК ретикулоциты, ранние гранулоциты, а также пролиферирующие лимфоцитарные клетки. Определенный вклад, вероятно, могут вносить также агрегированные с лейкоцитами тромбоциты и микровезикулы. Очевидно, этим и объясняется отсутствие в наших данных корреляции уровней мРНК и бластных клеток.

Полученные результаты подтверждают уже описанные факты обратной зависимости между экспрессией *WT1* и *HMGA*, связанной со способностью *WT1* увеличивать экспрессию микроРНК *let-7*, которая и уменьшает уровень мРНК *HMGA2* [17]. Вовлечением данной микроРНК также можно объяснить более высокий уровень экспрессии *WT1* и близкие к нулю уровни экспрессии *HMGA2*, поскольку PML-RAR $\alpha$ -позитивные бласты от пациентов с ОПЛ демонстрируют более низкие уровни *let-7c*, чем в обычных промиелоцитах [18].

Однако выявленная в наших исследованиях ассоциация Е-типа с высоким уровнем мРНК *HMGA2* и выраженный антагонизм экспрессии гена *PRAME* с всеми другими исследуемыми генами пока не находят однозначного объяснения.

Использованный нами подход, основанный на анализе относительного вклада отдельных мРНК в значения их суммарной активности, ранее не применялся, хотя он позволяет с меньшей погрешностью оценить соотношение активности разных генов по сравнению с оценкой соотношений широко вариабельных абсолютных значений. Важно отметить, что выделенные нами типы экспрессии мРНК лишь частично ассоциированы с тем или иным морфологическим вариантом острого лейкоза (см. рис. 2). Предполагается, что особенности соотношений активности выбранных нами генов в клетках могут свидетельствовать о формировании онкогенного характера регуляции их метаболизма, определяющего высокий риск злокачественной трансформации. При этом субпопуляции клональных клеток с отдельными вариантами транскриптомного профиля, очевидно, формируют определенные метаболические особенности лейкоэмических клеток в разной степени способствующие дальнейшей опухолевой эволюции. С данной точки зрения, выявление «ВЕРН-типов» экспрессии может оказаться полезным в качестве дополнительных прогностических маркеров лейкоза, а также потенциальных терапевтических мишеней.

Ограничения данного исследования связаны с его анонимным (слепым) характером и недостаточной информацией для анализа связей экспрессии исследованных мРНК с результатами морфологических, иммунофенотипических и цитогенетических исследований, а также данными об особенностях течения заболевания и эффективности используемой терапии. Также небольшой объем выборки не позволил оценить особенности экспрессии ком-

плекса выбранных мРНК в привязке к более узким нозологическим вариантам заболевания. Вместе с тем, результаты данного пилотного исследования позволили продемонстрировать перспективность дальнейшего изучения транскриптомного профиля и возможность использования разработанных нами диагностических наборов. Возражениям, которые могут относиться к адекватности выбора для анализа образцов цельной крови, а не моноцитарной фракции или изолированных лейкозных клеток как объекта исследования, на наш взгляд, можно противопоставить следующее: во-первых, заведомую неоднозначность вывода, что суммарные значения экспрессии, получаемые от всех РНК-позитивных клеток, имеют меньшую диагностическую эффективность; во-вторых, предложенный способ, безусловно, упрощает выполнение преаналитического этапа и последующее внедрение данного теста в практику клинических лабораторий.

**Заключение.** Впервые в мультиплексном формате ПЦР одновременно определены уровни пяти мРНК *WT1*, *BAALC*, *EVII*, *PRAME* и *HMGA2* в образцах цельной крови у пациентов с острыми лейкозами. Выявленные типы преимущественной экспрессии отдельных мРНК (ВЕРН-критерий) представлены в различных соотношениях при разных нозологических вариантах лейкоемии. Это поддерживает гипотезу первичной патогенетической роли дисбаланса РНК, формирующего отдельные транскриптомные субпопуляции лейкоэмических клеток.

---

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5–6, 9–10, 12–23  
см. REFERENCES)

1. Зуховицкая Е.В., Фиясь А.Т. Молекулярные механизмы лейкозогенеза и проблемы терапии острых лейкозов: монография. Гродно: Гродненский государственный медицинский университет; 2015.
2. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Гаврилина О.А., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых (редакция 2018 г.) [электронный документ]. Доступно по: [https://npngo.ru/uploads/media\\_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83bpdf](https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83bpdf). Ссылка активна на 30.03.2022.
3. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Грицаев С.В., Семочкин С.В., Бондаренко С.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых (редакция 2018 г.) [электронный документ]. Доступно по: [https://npngo.ru/uploads/media\\_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf](https://npngo.ru/uploads/media_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf). Ссылка активна на 30.03.2022.
4. Мамаев Н.Н., Гудожникова Я.В., Горбунова А.В. Гиперэкспрессия гена *WT1* при злокачественных опухолях системы крови: теоретические и клинические аспекты (обзор литературы). *Клиническая онкогематология*. 2016; 9(3):257-64. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264.
5. Мамаев Н.Н., Шакирова А.И., Морозова Е.В., Гиндина Т.Л. *EVII*-позитивные лейкозы и миелодиспластические синдромы: теоретические и клинические аспекты (обзор литературы). *Клиническая онкогематология*. 2021; 14(1):103–17. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-103-117.
6. Мисюрин В.А. Клиническое значение экспрессии гена *PRAME* при онкогематологических заболеваниях. *Клиническая онкогематология*. 2018; 11(1):26–33. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-26-33.

REFERENCES

1. Zukhovitskaya E.V., Fiyas A.T. Molecular mechanisms of leukemia and problems in the treatment of acute leukemia: monograph. Grodno: Grodnenskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2015. (in Russian)
2. Handschuh L. Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies. *J. Oncol.* 2019; 2019:7239206. DOI: 10.1155/2019/7239206.
3. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasyev B.V., Troitskaya V.V., Gavrilina O.A., Sokolov A.N. et al. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemias in adults. [Internet]. Available from: [https://npngo.ru/uploads/media\\_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf](https://npngo.ru/uploads/media_document/293/556718e9-0ff5-46f3-bff8-bd592c83b992.pdf). (accessed 30.03.2022). (in Russian)
4. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasyev B.V., Gritsaev S.V., Semochkin S.V., Bondarenko S.N. et al. Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. 2018. [Internet]. Available from: [https://npngo.ru/uploads/media\\_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf](https://npngo.ru/uploads/media_document/280/1889f8fa-440a-47fe-9040-a853983d85bd.pdf). (accessed 30.03.2022). (in Russian)
5. Cilloni D., Renneville A., Hermitte F., Hills R.K., Daly S., Jovanovic J.V. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(31):5195-201. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.4865.
6. Thol F., Yun H., Sonntag A.K., Damm F., Weissinger E.M., Krauter J., et al. Prognostic significance of combined MN1, ERG, BAALC, and EVI1 (MEBE) expression in patients with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2012; 91(8):1221-33. DOI: 10.1007/s00277-012-1457-7.
7. Mamaev N.N., Gudozhnikova Ya.V., Gorbunova A.V. WT1 Gene Overexpression in Oncohematological Disorders: Theoretical and Clinical Aspects (Literature review). *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2016; 9(3):257-64. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-257-264. (in Russian)
8. Mamaev N.N., Shakirova A.I., Morozova E.V., Gindina T.L. EVI1-Positive Leukemias and Myelodysplastic Syndromes: Theoretical and Clinical Aspects (Literature review). *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2021; 14(1):103-17. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-103-117. (in Russian)
9. Mamaev N., Shakirova A., Barkhatov I., Kanunnikov M., Gindina T., Rakhmanova Z., et al. Evaluation of BAALC- and WT1-expressing leukemic cell precursors in pediatric and adult patients with EVI1-positive AML by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). *Cellular Therapy and Transplantation. Foundation for the Development of Bone Marrow Transplantation.* 2021; 10(2):54-9. DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-2-54-59.
10. Azizi Z., Rahgozar S., Moafi A., Dabaghi M., Nadimi M. mRNA overexpression of BAALC: A novel prognostic factor for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Biomed. Rep.* 2015; 3(3):371-4. DOI: 10.3892/br.2015.437.
11. Misyurin A.V. Clinical Significance of the PRAME Gene Expression in Oncohematological Diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2018; 11(1):26-33. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-26-33. (in Russian)
12. Zhang S., Mo Q., Wang X. Oncological role of HMGA2 (Review). *Int. J. Oncol.* 2019;55(4):775-88. DOI: 10.3892/ijo.2019.4856.
13. Rommel B., Rogalla P., Jox A., Kalle C.V., Kazmierczak B., Wolf J. et al. HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk. Lymphoma.* 1997; 26(5-6):603-7. DOI: 10.3109/10428199709050896.
14. Mansoori B., Mohammadi A., Ditzel H.J., Duijf P.H.G., Khaze V., Gjerstorff M.F., et al. HMGA2 as a Critical Regulator in Cancer Development. *Genes (Basel).* 2021; 12(2):269. DOI: 10.3390/genes12020269.
15. Yuen K.Y., Lin X.Y., Zhou Y.Z., Luo H., Liu Y., Xu L.H. Optimal time-points for detecting expression levels of BAALC, EVI1, and WT1 genes in patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Hematology.* 2021;26(1):995-1006. DOI: 10.1080/16078454.2021.2006409.
16. Wu X., Wang H., Deng J., Zheng X., Ling Y., Gong Y. Prognostic significance of the EVI1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Ann. Hematol.* 2019; 98(11):2485-96. DOI: 10.1007/s00277-019-03774-z.
17. Xiao S.J., Shen J.Z., Huang J.L., Fu H.Y. Prognostic significance of the BAALC gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 2015; 3(4):880-8. DOI: 10.3892/mco.2015.562.
18. Weber S., Alpermann T., Dicker F., Jeromin S., Nadarajah N., Eder C. et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2014; 4(1):e173. DOI: 10.1038/bcj.2013.71.
19. Hinai A.A., Valk P.J. Review: Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2016; 172(6):870-8. DOI: 10.1111/bjh.13898.
20. Gröschel S., Lugthart S., Schlenk R.F., Valk P.J., Eiwen K., Goudswaard C., et al. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(12):2101-7. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.0646.
21. Andrew R.J. Young and Masashi Narita Oncogenic HMGA2: short or small? *Genes & Dev.* 2007; 21:1005-9. DOI: 10.1101/gad.1554707.
22. Bharathavikru R., Slight J., Aitken S., Petrovich G., Charlton J., Stancheva V. et al. Tumour suppressor WT1 regulates the let-7-Igflr axis in kidney mesenchyme. *Cold Spring Harbor Laboratory.* 2019. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/822973>. DOI: <https://dx.doi.org/10.1101/822973>.
23. Pelosi A., Carecchia S., Lulli V., Romania P., Marziali G., Testa U. et al. miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 2013; 32(31):3648-54. DOI: 10.1038/onc.2012.398.